



⑩ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 101 55 098 A 1**

⑤ Int. Cl. 7:  
**A 61 K 38/10**  
A 61 K 31/7016

⑲ Aktenzeichen: 101 55 098.7  
⑳ Anmeldetag: 9. 11. 2001  
㉑ Offenlegungstag: 22. 5. 2003

DE 101 55 098 A 1

⑪ Anmelder:  
Supramol Parenteral Colloids GmbH, 61191  
Rosbach, DE

⑰ Erfinder:  
Sommermeyer, Klaus, Dr., 61191 Rosbach, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Mittel zur Prävention von mykotischen Kontaminationen bei der Zell- und Gewebekultur bakteriellen, pflanzlichen, animalischen und humanen Ursprungs, bestehend aus Polyen-Makrolid-Konjugaten mit Polysacchariden

⑤⑦ Bei der Kultivierung von Gewebe und Zellen bakteriellen, pflanzlichen oder animalischen Ursprungs bzw. menschlichen Ursprungs müssen oft trotz aseptischer Verfahrensweise präventiv Antimykotika wie Amphoterizin B oder Nystatin eingesetzt werden. Diese Verbindungen haben jedoch Nachteile wie z. B. Nebenwirkungen auf die Zell- und Gewebekulturen. Außerdem weisen diese Verbindungen alle eine nicht ausreichende Wasserlöslichkeit auf, die nachteilig ist. Es sollten deshalb neue Mittel zur Verwendung als Antimykotika bei der Zell- bzw. Gewebekultur gefunden werden, die diese Nachteile nicht oder nur reduziert aufweisen.

Die neuen Mittel zur Verwendung als Antimykotika bei den Zell- bzw. Gewebekulturen bakteriellen, pflanzlichen und animalischen Ursprungs sind Derivate der Polyen-Makrolid-Antimykotika Amphoterizin B, Nystatin oder Natamycin, die über eine Amidbindung mit dem Polysaccharidanteil verknüpft sind, wobei dessen reduzierende Endgruppe vor der Konjugation zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert wurde.

Mittel zur präventiven antimykotischen Behandlung von Zell- und Gewebekulturen bakteriellen, pflanzlichen, animalischen und menschlichen Ursprungs.

DE 101 55 098 A 1

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von wasserlöslichen Zubereitungen von Polye-Makrolid-Antimykotika in Form von Konjugaten mit Polysacchariden auf Basis von Stärke oder Stärkederivaten, insbesondere Hydroxyethylstärke und Hydroxypropylstärke zur Prävention mykotischer Kontaminationen bei der Zell- und Gewebekultur auf bakterieller, pflanzlicher, animalischer und humaner Basis.

[0002] Die strukturell eng verwandten Polye-Makrolid-Antibiotika Natamycin, Nystatin und Amphoterizin B sind bekannte fungistatische bzw. fungizide Verbindungen, die in der Medizin unterschiedlich eingesetzt werden. So ist zum Beispiel Amphoterizin B ein aus *Streptomyces nodosus* isoliertes Polye-Antimykotikum. Chemisch handelt es sich um ein makrocyclisches Lacton (Makrolid) mit 7 konjugierten Doppelbindungen in all-trans-Konfiguration innerhalb eines 38-gliedrigen Lactonrings, an welchen über eine O-glykosidische Bindung der Aminozucker D-Mycosamin gebunden ist.

[0003] Amphoterizin B ist amphoter und besitzt lipophile und hydrophile Regionen im Molekül, welche es befähigen, mit den in der Cytoplasmamembran von Pilzen enthaltenen Sterolen Komplexe zu bilden, was zu einer Störung der Zellpermeabilität führt. Da Bakterienmembranen keine Sterole enthalten, ist die antibiotische Wirkung von Amphoterizin B selektiv gegen Pilze gerichtet.

[0004] Wegen des breiten Wirkungsspektrums von Amphoterizin B gegen praktisch alle humanpathogenen Pilze ist es für die systemische Behandlung mykotischer Infektionen beim Menschen das Mittel der Wahl. Amphoterizin B weist einige gravierende Nebenwirkungen bei der intravenösen Applikation auf, die teilweise auch mit seiner geringen Wasserlöslichkeit im physiologischen pH-Bereich und dem dadurch bedingten Einsatz von Lösungsvermittlern zusammenhängt. Die Handelspräparate des Amphoterizin B sind deshalb relativ kompliziert aufgebaut, auch teilweise teuer herzustellen und weisen deshalb zusätzliche Nachteile diesbezüglicher Art auf. Die Wasser-Schwerlöslichkeit trifft auch zu für die engen Strukturverwandten Natamycin und Nystatin, welche derzeit nur als Arzneimittel in topischen Formen eingesetzt werden.

[0005] Das zur Infusion vorgesehene Originalpräparat des Amphoterizin B von BRISTOL-MYERS SQUIBB (in Deutschland unter der Handelsbezeichnung "Amphoterizin B" erhältlich) liegt zum Beispiel als Trockensubstanz vor, welche mit Wasser rekonstituiert werden muß und liegt dann als mizellare Dispersion von Amphoterizin B mit Na-Desoxycholat vor. Um eine applikationsfähige Infusionslösung zu erhalten, kann die so erhaltene Stammlösung nur mit elektrolytfreien Trägerlösungen wie zum Beispiel einer 5%-igen Glucoselösung bis zur erwünschten Endkonzentration verdünnt werden. Dieses Präparat weist zudem nur einen geringen Therapeutischen Index auf, d. h. das Fenster zwischen effektiver und toxischer Dosis ist sehr schmal. Darüber hinaus ist, trotz des relativ breiten Wirkungsspektrums von Amphoterizin B, dieses Präparat bei bestimmten Krankheitsbildern wenig effektiv, weil die Wirksubstanz den Ort der mykotischen Infektion nicht oder nur in zu kleinen Konzentrationen erreicht, so dass Amphoterizin B dort seine charakteristische antifungale Wirkung nicht oder nur unzureichend entfalten kann.

[0006] Um die Nachteile des Originatorpräparates zu überwinden, wurde eine Reihe von Amphoterizin B-Präparaten entwickelt, welche Lipidformulierungen darstellen, zum Beispiel Lipidkomplexe mit Amphoterizin B, kolloide Dispersionen von Cholesteryl-sulfat mit Amphoterizin B und

liposomal verpacktes Amphoterizin B. Alle diese Arzneiformen weisen zwar einen größeren therapeutischen Index und eine höhere Verträglichkeit, insbesondere eine geringere Nephrotoxizität im Vergleich mit einer herkömmlichen Amphoterizin B-Desoxycholat-Formulierung auf, weshalb sie auch in höheren Dosen verabreicht werden können, dennoch lassen sich bei hohen Dosen die oben beschriebenen Nebenwirkungen nicht ganz vermeiden.

[0007] Ein gravierender Nachteil solcher Lipidformulierungen von Amphoterizin B ist jedoch in den sehr hohen Herstellungskosten und den damit verbundenen Handelspreisen zu sehen. Darüber hinaus müssen diese komplizierten Arzneiformen bis zu ihrer applikationsfertigen Form nach wie vor in umständlicher Weise rekonstituiert werden. Nicht zuletzt wegen dieser Nachteile ist trotz der verbesserten therapeutischen Breite bei den Lipidformulierungen des Amphoterizins B eine breite Akzeptanz auf dem Markt ausgeblieben.

[0008] Es wurde nun gefunden, dass gemäß Deutscher Patentanmeldung 101 29 369.0 wasserlösliche Amphoterizin B-Konjugate mit Polysacchariden herstellbar sind, die nebenwirkungsfreier als das Original sind und eine hohe Wasserlöslichkeit aufweisen und zudem kostengünstig herstellbar sind.

[0009] Wir haben nun festgestellt, dass zwar mit zunehmendem Molekulargewicht des Polysaccharidanteils die Wasserlöslichkeit der nach DP 101 29 369.0 hergestellten Polysaccharidderivate des Amphoterizin B stark zunimmt und das Ausmaß der Nebenwirkungen, gemessen als die in vitro gemessene Hämolyserate abnimmt, gleichzeitig aber die in vitro fungizide bzw. fungistatische Wirksamkeit relativ zum Originalpräparat beeinträchtigt wird.

[0010] Bei einem parenteralen Einsatz von Amphoterizin B-Konjugaten der obigen Form ist diese Abnahme der Wirksamkeit unproblematisch, da nach der intravenösen Injektion ein durch die Serum- $\alpha$ -Amylase verursachter Abbau zum Beispiel des Hydroxyethylstärkeanteils erfolgt (durch Spaltung der  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen der Anhydroglucosen), so daß die in vivo Wirksamkeit der Abbauprodukte wieder zunimmt im Vergleich zu dem Originalpräparat und damit bei Vermeidung aller Nachteile des freien Amphoterizin B vergleichbar ist mit der Wirksamkeit dieser Verbindung.

[0011] Überraschenderweise haben wir nun festgestellt, dass Hydroxyethylstärke - Amphoterizin B-Konjugate nach DP 101 29 369.0 (Amphoterizin B-Hesylate) mit einem Molekulargewicht des Hydroxyethylstärkeanteils von < 80.000 Dalton, also unterhalb der menschlichen Nierenschwelle, eine im Vergleich zum undervatisierten Amphoterizin B stark reduzierte in vitro Hämolyserate aufweist, gleichzeitig eine nahezu unveränderte in vitro fungizide und fungistatische Wirkung aufzeigt, die ausreichend ist, um Zell- oder Gewebekulturen auf bakterieller, pflanzlicher, animalischer bzw. humaner Basis vor eventuellen Kontaminationen durch Pilze zu schützen. Der Einsatz von Antimykotika bei der Zell- und Gewebekultur ist auch trotz entsprechender aseptischer Arbeitsweisen oft notwendig. Dabei richtet sich die Konzentration der Antimykotika nach dem Medium, den Zelltypen bzw. Gewebetypen und der jeweils ermittelten zytotoxischen Konzentration der Antimykotika. Es ist nun besonders vorteilhaft, dass die erfindungsgemäßen Konjugate nicht oder nur sehr schwer in die Zellen penetrieren können und dass sie weiterhin nicht zytotoxisch bzw. hämolytisch wirken. Sie sind ausreichend wasserlöslich und können als Langzeit lagerungsstabile Lyophilisate leicht vor Applikation zu den Zell- bzw. Gewebekulturen rekonstituiert werden. Sie sind physikalisch-chemisch kompatibel mit den gängigen Zell- bzw. Gewebekulturbedien. Ihre

Einsatzkonzentration richtet sich, wie oben beschrieben, nach den entsprechenden Randbedingungen, die zell- bzw. gewebe kulturabhängig erforderlich sind.

## Patentansprüche

5

1. Mittel zur Verwendung bei der Zell- oder Gewebekultur bakterieller, pflanzlicher, animalischer und menschlicher Zellen oder Gewebe zur Protektion möglicher mykotischer Kontaminationen, bestehend aus wasserlöslichen Polyen-Makrolid-Polysaccharid-Konjugaten der allgemeinen Formel

A-NH-R

wobei

A-NH – die Polyen-Makrolidreste von Amphotericin B, Nystatin oder Natamycin bedeuten, die über ihre freie NH<sub>2</sub> Gruppe in einer Amidbindung an R konjugiert sind und

R – ein an der reduzierenden Endgruppe zur Carbonsäure bzw. Lacton oxidierter Polysaccharidrest auf Basis von Stärke oder Stärkederivaten in Amidbindung an die NH<sub>2</sub> Gruppen der Polyen-Makrolide bedeutet.

2. Verwendung wasserlöslicher Polyen-Makrolid-Derivate gemäß Anspruch 1, wobei R – Hydroxyethylstärke bzw. Hydroxypropylstärke-Derivate, ihrer Stärkekompontenten Amylopektin oder Amylose bedeuten, deren Molekulargewicht  $\leq 80.000$  Dalton ist.

3. Verwendung von wasserlöslichen Amphotericin B-Derivaten gemäß Anspruch 2, wobei R – eine an der terminalen reduzierenden Endgruppe oxidierte Hydroxyethylstärke bedeutet die in Amidbindung zur NH<sub>2</sub> Gruppe des Amphotericin B vorliegt und der Substitutionsgrad MS der Hydroxyethylstärke zwischen 0,1 und 0,8 liegt und das Verhältnis der Substitution an den Kohlenstoffatomen 2 und 3 der Anhydroglucosen zwischen 3 und 15 liegt.

40

45

50

55

60

65